

PROGRAMA COOPERATIVO PARA LA PROTECCION Y MODERNIZACION DE LA CAFICULTURA

- PROMECAFE -

PROYECTO REGIONAL DE RESISTENCIA A LOS NEMATODOS DEL CAFE DE CENTROAMERICA

PROMECAFE-IICA-CATIE / CIRAD (FRANCIA)

FINANCIAMIENTO UNION EUROPEA

INFORME TECNICO DEL PROYECTO

INVESTIGADORES PROMECAFE/ANACAFE-GUATEMALA

PERIODO MARZO 1995 - FEBRERO 1996

GRUPO TECNICO PROMECAFE/ANACAFE :

Dr. Francisco Anzueto  
Fitomejorador ANACAFE-GUATEMALA

Ing. Luc Villain  
Nematólogo PROMECAFE/CIRAD

Ing. Amauri Molina  
Investigador ANACAFE-GUATEMALA

## 1. INTRODUCCION

Durante el tercer año del Proyecto se desarrollaron las actividades contenidas en el Plan General, las mismas incluyeron evaluaciones de resistencia con los géneros de nemátodos *Meloidogyne* y *Pratylenchus*, por otra parte se continuaron los estudios de patogenicidad con diferentes poblaciones de *Pratylenchus*.

Las evaluaciones de resistencia se realizaron con genotipos de la variedad "Robusta" de *C. canephora*, utilizando híbridos de polinización controlada y descendencias de polinización libre.

Desde el inicio del Proyecto se orientaron los trabajos a la evaluación y desarrollo de una variedad porta-injertos en *C. canephora* considerando los siguientes factores: - que la resistencia a nemátodos en esta especie de café podría ser más amplia y duradera, - que existe una técnica de injertación que es practicada en escala comercial utilizando materiales de "Robusta" no seleccionados, - en base a lo anterior se tiene la posibilidad de utilizar en el corto plazo los materiales seleccionados como variedad porta-injerto para las variedades comerciales que son cultivadas en Centroamérica.

## 2. ACTIVIDADES DE INVESTIGACION

### 2.1 EVALUACION DE LA RESISTENCIA AL NEMATODO *MELOIDOGYNE SP.* EN HIBRIDOS DE POLINIZACION CONTROLADA DE *C. CANEPHORA* CV "ROBUSTA".

En el informe del segundo año del Proyecto se presentó un avance de la investigación. En este trabajo se evaluó un plan factorial de descendencias híbridas de polinización controlada. Como plantas madre se utilizaron los genotipos: T3757 (2-2), T 3757 (2-1), T 3751 (1-2) y T 3561 (2-1). El detalle de los híbridos se presenta en la primera columna del cuadro 1.

Plantas jóvenes de estos materiales fueron inoculados con una población de *Meloidogyne sp.*, origen "Los Manaques". El experimento fue concluido luego de un período de 8 meses de observaciones. La información del cuadro 1 presenta para cada híbrido el número de plantas evaluadas y la calificación individual de las plantas de acuerdo a una escala de "Índice de Daño" en raíces, en esta escala los valores van del 0 al 5 los cuales representan consecutivamente niveles más intensos de daños provocados por nemátodos. De esta manera el índice 0 representaría una raíz sana, sin presencia de masas de huevos exteriores y/o agallas, al final del cuadro se explican las características correspondientes a cada valor de la escala. La variedad de referencia es CATUAI, que es una variedad reconocida como susceptible a los nemátodos.

En CATUAI las plantas presentaron índices de daño con valores 4 y 5, que corresponden a elevados niveles de destrucción de las raíces provocados por nemátodos, esto se interpreta como una evidente reacción de susceptibilidad.

En los híbridos donde participan como progenitor materno los genotipos T 3757 (2-2) y T3757 (2-1), se observa una gran cantidad de plantas con niveles de daño similares a las plantas de la variedad CATUAI. Al realizar los cálculos en estos híbridos de *C. canephora* se obtiene 68% de plantas con reacción de susceptibilidad.

**Cuadro 1 : Respuesta de híbridos de *C. canephora* al nemátodo *Meloidogyne* sp.**

Híbrido	Plantas Evaluadas	Plantas por índice de daño (*)					
		0	1	2	3	4	5
3757 (2-2) * 3753 (1-1)	22				3	15	4
* 3759 (2-2)	20				8	12	
* 3754 (1-1)	10			3	4	3	
* 3479 (a-3)	20			1	10	9	
* 4004	10			3	3	5	1
* 3752 (1-3)	12				1	10	1
* 3752 (2-2)	20			1	3	15	1
* 3752 (1-1)	20			1	6	12	1
* 3755 (1-1)	20				3	16	1
Subtotales por índice:				9	41	95	9
3757 (2-1) * 4135	18			2	3	13	
* 3752 (2-2)	20		1		4	13	2
* 3754 (1-1)	30		1	2	8	18	1
* 3752 (1-3)	20			3	7	10	
* 3759 (2-2)	10			2	3	4	1
* 3752 (1-1)	20			1	1	18	
Subtotales por índice:			2	10	26	76	4
3751 (1-2) * 3479 (a-3)	19		7	4	3	5	
* 4135	20		2	4	9	5	
* 4004	34	3	2	9	9	10	1
* 3752 (1-3)	6	1		1	4		
* 3759 (2-2)	10	1		1	3	5	
Subtotales por índice:		5	11	19	28	25	1
3561 (2-1) * 3752 (2-2)	20	1	7	4	3	4	1
* 4004	20		3	4	2	10	1
* 3755 (1-1)	14	1		2	2	7	2
* 3754 (1-1)	14		4	4	4	2	
* 3479 (a-3)	12	1	3	3	5		
* 3759 (2-2)	18	1	1	1	8	7	
Subtotales por índice:		4	18	19	24	30	4
3561 polinizacion libre	12		2	2	3	5	
CATUAI (testigo)	10					8	2

(\*) Índice o intensidad de daño :

- 0 = Raíz sana, sin masas de huevos exteriores y/o agallas
- 1 = Raíz limpia sin necrosis, presencia de masas y/o agallas
- 2 = Raíz con necrosis ( $\leq 25\%$ ), presencia de masas y/o agallas
- 3 = Raíz con necrosis (25-50%), presencia masas y/o agallas
- 4 = Pivotante corchosa y necrosada (75-100%), poca cabellera
- 5 = Pivotante necrosada, ausencia de cabellera.

En los híbridos que tienen como progenitores maternos a los genotipos T 3751 (1-2) y T 3561 (2-1) se notó una tendencia diferente. En este caso, la mayoría de plantas mostraron una reacción de resistencia al nemátodo. Para los híbridos del T3751 (1-2) se tiene un valor aproximado de 71% de plantas resistentes y 29% de susceptibles. Para los híbridos del T3561(2-1) se observó 66% de plantas resistentes y 34% de susceptibles.

Este estudio ha confirmado que los genotipos T3751(1-2) y T3561 (2-1) presentan un buen nivel de resistencia a poblaciones de *Meloidogyne spp.*, y que pueden a su vez, transmitir ese comportamiento a las descendencias híbridas donde participen como progenitores. La propuesta técnica será la utilización de estos dos genotipos para desarrollar una variedad híbrida entre ambos.

En la lámina 1 se muestran tres fotografías relativas al experimento, las cuales se comentan a continuación:

Foto 1: Comparación de la respuesta a *Meloidogyne sp.* entre plantas del híbrido de *C. canephora* Var Robusta [T 3757 (2-2) x T 3753 (1-1)] y el testigo susceptible Catuaí. Puede observarse que las plantas de Robusta presentan un nivel de daño similar a la variedad Catuaí. En Robustas sin selección se esperaría tener, al menos, 65% de plantas susceptibles frente a *Meloidogynes* "agresivos".

Foto 2: Comparación de la respuesta a *Meloidogyne sp.* entre plantas de los híbridos de *C. Canephora* Var Robusta, [T 3561 (2-1) x T 3479 (a-3)] y [T3757 (2-2) x T 3753 (1-1)]. Las plantas de la izquierda tienen como progenitor materno al genotipo T 3561(2-1), las mismas evidencian una reacción de resistencia a *Meloidogyne sp.* Por el contrario, las plantas de la derecha muestran una respuesta de susceptibilidad, esto indica que los progenitores no poseen características de resistencia genética, y en consecuencia ningún interés para los programas de selección.

Foto 3: Respuesta a *Meloidogyne sp.* en híbridos de *C. canephora* Var. Robusta, en cada uno de los híbridos participa como uno de los progenitores maternos los genotipos T3751 (1-2) y T 3561 (2-1) respectivamente. Se observa un buen nivel de resistencia al nemátodo en los materiales donde están presentes dichos genotipos. Estos serán clonados para su reproducción y establecimiento de jardines biclonales para la producción de semilla híbrida destinada a los programas de injertación comercial.



FOTO 1

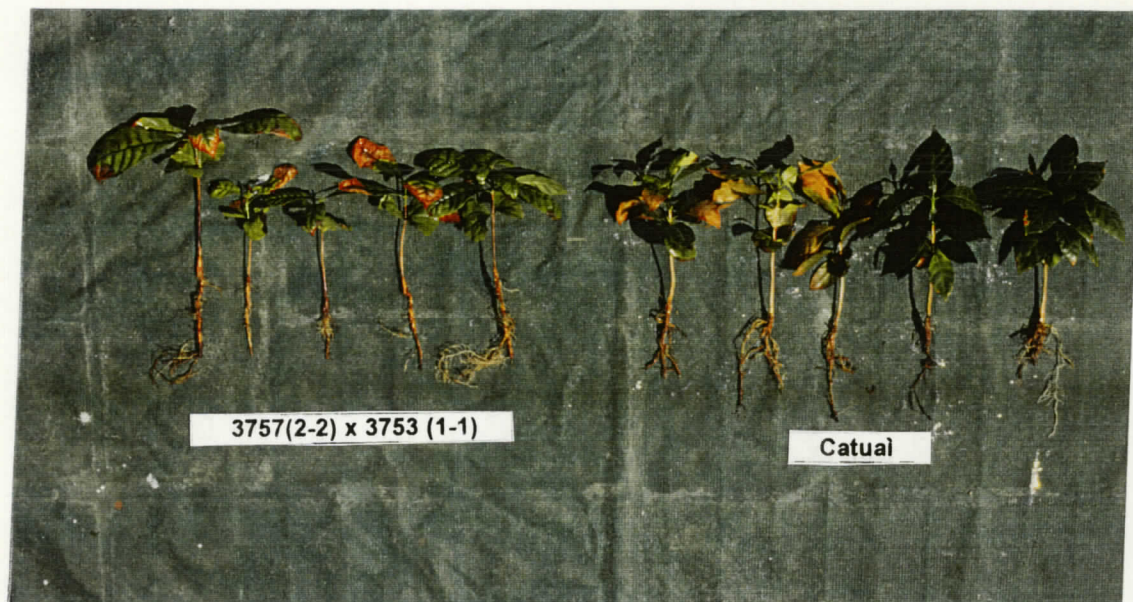


FOTO 2



FOTO 3



## 2.2 EVALUACION DE TOLERANCIA AL NEMATODO *PRATYLENCHUS* SPP. EN DESCENDENCIAS DE POLINIZACION LIBRE DE *C. CANEPHORA* Var ROBUSTA.

El propósito de este estudio fue comparar la tolerancia a *Pratylenchus* spp. de:

- descendencias libres de los dos genotipos de *C. canephora* var. Robusta identificados como resistentes a las poblaciones de *Meloidogyne* spp. de Guatemala: T 3751 (1-2) y T 3561 (2-1),

- la descendencia libre del genotipo T 3752 (1-3) identificado como susceptible a estas mismas poblaciones de nemátodos,

- y *C. arabica* var. Catuaí como testigo.

Seis meses después de inocular plantas jóvenes con 100 nematodos de la población "Buena Vista" se realizó la evaluación de las variables vegetativas: altura, pesos frescos foliar y de raíces, y la preparación de raíces para determinar los niveles poblacionales del nematodo. Están pendientes los conteos de *Pratylenchus* sp., pero se tiene los datos de las variables vegetativas, presentados en las gráficas 1, 2 y 3.

Para la variable altura, unicamente la variedad Catuaí presenta una supresión significativa del crecimiento por efecto del nemátodo. Las variables de peso fresco son las más importantes porque dan un índice confiable de la viabilidad y desarrollo potencial de las plantas. Los resultados de estas variables permiten demostrar:

- la alta susceptibilidad de Catuaí a *Pratylenchus* sp. con una pérdida promedio del 88 % de su peso fresco total y 93 % de su peso fresco de raíces en relación con su testigo no inoculado. Esta susceptibilidad del Catuaí también se ha observado frente a poblaciones de *Meloidogyne* spp.

- cierto nivel de tolerancia de las 3 descendencias de *C. canephora* var. Robusta, que muestran sin embargo una pérdida de peso fresco total según el genotipo evaluado : 44% el T 3561 (2-1), 49% el T 3751 (1-2) y 62% el T 3752 (1-3).

Se puede ver que la descendencia del T 3752 (1-3) -igualmente susceptible a *Meloidogyne* spp. de Guatemala- también muestra el nivel más bajo de tolerancia a *Pratylenchus* sp. Este genotipo tuvo una pérdida de 79 % de su peso fresco de raíces, mientras que los otros genotipos, el T 3561 (1-2) y T 3751 (1-2) mostraron reducciones de 55 % y 57 % respectivamente. Estos materiales habían sido identificados como altamente resistentes a las poblaciones de *Meloidogyne* spp. de Guatemala. Los resultados de este experimento sugerirían una probable relación entre la resistencia a *Meloidogyne* spp. de Guatemala y un buen nivel de tolerancia a *Pratylenchus* spp.



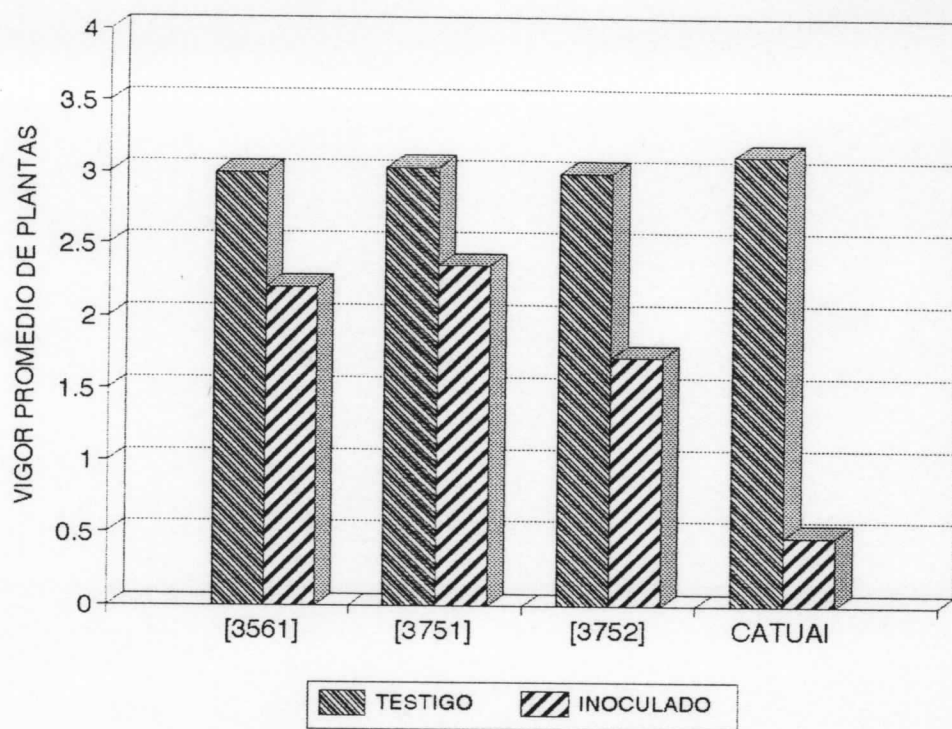


Figura 1: Vigor promedio de las plantas de cada material vegetal: 3561 (2-1) ; 3751 (1-2) ; 3752 (1-3) y Catuai , no inoculado (Testigo) e inoculado con una escala establecida de 0 a 4: 0 = planta muerta; 1 = planta muy poca vigorosa; 2 = planta poca vigorosa; 3 = planta vigorosa pero con algunas deficiencias; 4 = planta vigorosa sin deficiencias.

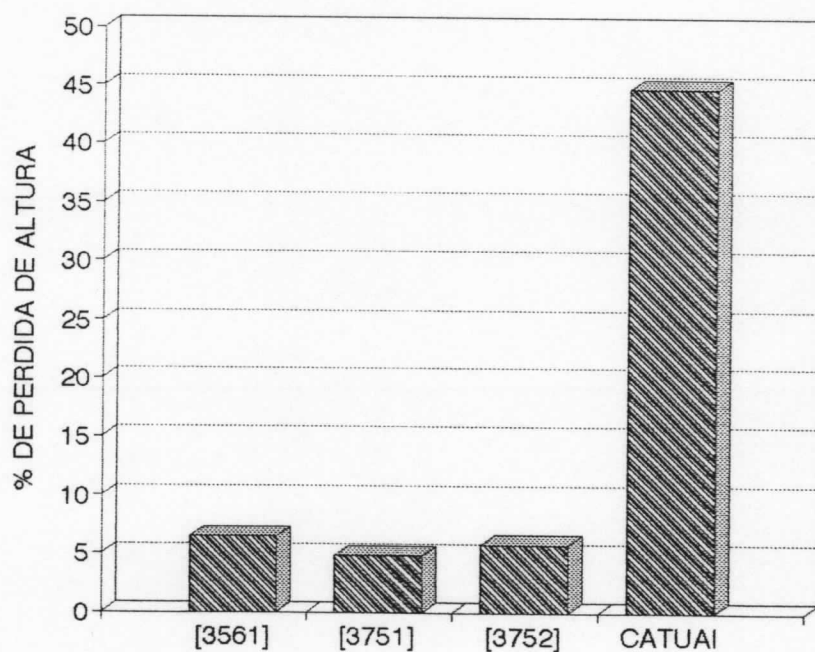


Figura 2: Porcentaje de perdida de altura para cada material vegetal: 3561 (2-1) ; 3751 (1-2) ; 3752 (1-3) y Catuai, en relación con su testigo respectivo no inoculado.

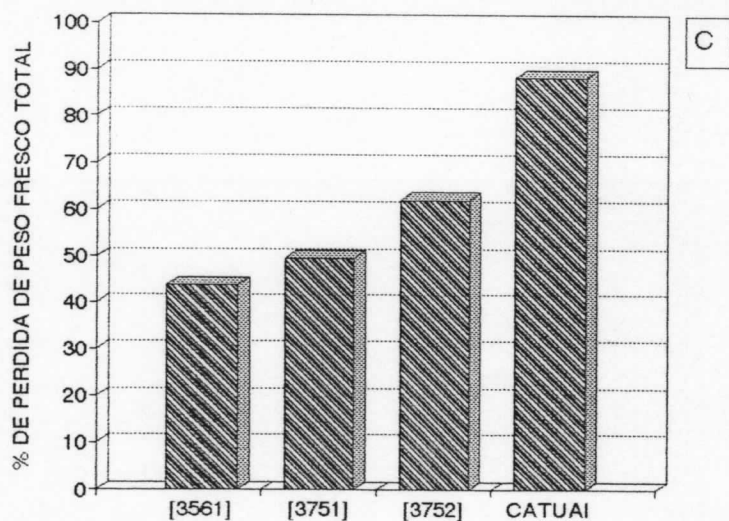
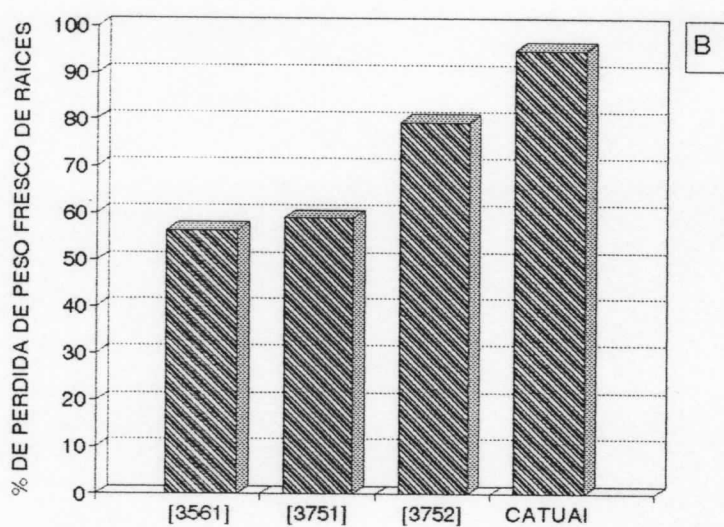
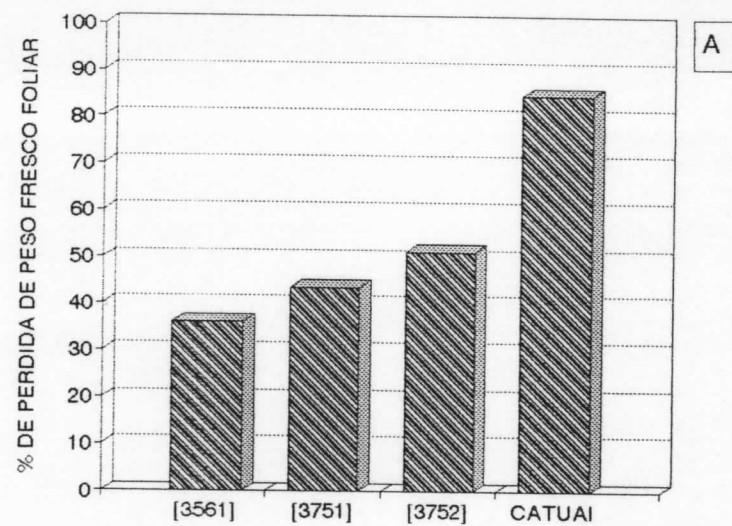


Figura 3 : Porcentajes de pérdida de peso fresco: foliar: A; de raíces: B; total: C; para cada material vegetal: 3561 (2-1) ; 3751 (1-2) ; 3752 (1-3) y Catuai, en relación con su testigo respectivo no inoculado.



En la lámina 2 se presentan las fotografías 4, 5 y 6 que ilustran los resultados del experimento, y que se comentan a continuación:

Foto 4: Plantas de la variedad Catuaí. A la izquierda se presenta el grupo de plantas inoculadas y a la derecha las plantas no inoculadas. Las diferencias en el desarrollo vegetativo entre ambos grupos, evidencia la poca tolerancia de esta variedad al nemátodo *Pratylenchus sp.*

Foto 5: Plantas de descendencia libre del genotipo T 3752 (1-3). A la izquierda se presenta el grupo de plantas inoculadas y a la derecha las plantas no inoculadas. En las plantas inoculadas hubo una mortandad del 40%, este genotipo no presenta un buen nivel de tolerancia a *Pratylenchus sp.* De igual manera este material se mostró como altamente susceptible a *Meloidogyne sp.*

Foto 6: Plantas de descendencia libre del genotipo T 3561 (2-1). A la izquierda se presenta el grupo de plantas inoculadas y a la derecha las plantas no inoculadas. En las plantas inoculadas hubo una mortandad del 12%, al respecto y tomando en cuenta el rigor del experimento, este genotipo muestra un buen nivel de tolerancia a *Pratylenchus sp.* El T 3561(2-1) es también uno de los materiales destacados por su resistencia a *Meloidogyne spp.*

FOTO 4



FOTO 5



FOTO 6





### 2.3 ESTUDIOS DE PATOGENICIDAD DE PRATYLENCHUS SPP. EN COFFEA ARABICA Var. CATUAI Y C. CANEPHORA Var. ROBUSTA.

Para completar los estudios de patogenicidad de *Pratylenchus spp* se estableció otro experimento con los siguientes objetivos :

- estudiar otra población geográfica de *Pratylenchus spp* originaria de una región cafetalera aislada,
- comparar la patogenicidad de una población de *Pratylenchus spp* sobre *C. canephora* var Robusta y *C. arabica*.

En este nuevo experimento se compara la patogenicidad de 2 poblaciones de *Pratylenchus spp.*: "Moca" y "Chitalón", estudiadas anteriormente, con una tercera población colectada en la región cafetalera de Cobán en el norte de Guatemala. Esta región presenta el interés de ser una zona aislada con muy poco intercambio de material vegetal con las otras zonas cafetaleras. Hay indicios experimentales de una multiplicación lenta observada *in vitro* en discos de zanahoria, esto nos permite pensar que la población "Coban" podría tener un nivel más bajo de patogenicidad.

Se utiliza la misma metodología que en el estudio anterior, o sea, inoculación en macetas con 100 nemátodos de una determinada población de *Pratylenchus spp.* por planta, en el estadio "un par de hojas verdaderas". Se inocularon las tres poblaciones "Chitalón", "Cobán" y "Moca" sobre Catuaí y adicionalmente "Moca" sobre el genotipo T 3751 (1-2) de *C. canephora* de descendencia libre, identificado como resistente a poblaciones de *Meloidogyne spp* de Guatemala. Se utiliza como referencia la misma cantidad de plantas de Catuaí y *C. canephora* sin inocular.

Con el fin de obtener resultados sobre la evolución de los niveles de población del nemátodo se hacen tres lecturas a diferentes momentos: 50, 100 y 150 días después de la inoculación. Se mide también la altura, el peso fresco foliar, el peso fresco de raíces.

Hasta la fecha solo se ha realizado la primera lectura. En las variables vegetativas: altura y pesos frescos, aún no se observa diferencia significativa entre las plantas inoculadas y no inoculadas para las tres poblaciones. Contrariamente se observan diferencias de multiplicación entre las tres poblaciones del nematodo, las cuales se muestran en el Cuadro 2.

**Cuadro 2:** Niveles poblacionales de *Pratylenchus* spp. después de 50 días después de la inoculación para cada población geográfica del nemátodo sobre *C. arabica* var. Catuai y *C. canephora* var. Robusta.

MATERIAL VEGETAL	<i>C. arabica</i> var Catuai			<i>C. canephora</i> var Robusta
POBLACION	COBAN	CHITALON	MOCA	MOCA
NIVEL DE POBLACION TOTAL *	200	1000	550	220

\* el nivel de población corresponde al conteo sin tomar en cuenta los huevos.

Se puede observar que:

- De las 3 poblaciones multiplicadas sobre *C. arabica* var. Catuai, "Cobán" tiene la tasa de multiplicación de nemátodos más baja.

- La tasa de multiplicación de "Moca" es menor sobre *C. canephora* var. Robusta que sobre *C. arabica*. Es necesario esperar los resultados de las 2 otras lecturas para poder sacar conclusiones, sin embargo estos primeros resultados concuerdan con otros estudios (Anzueto, 1993), en los cuales se había observado una multiplicación más lenta de *Pratylenchus* sp. sobre *C. canephora* que sobre *C. arabica*. Como complemento a este experimento se está realizando un estudio de la tasa de multiplicación de estas 3 poblaciones de nematodos, esto se conduce *in vitro* sobre discos de zanahoria con inoculación de un numero preciso de nematodos. Aún no se tienen resultados.

### 3. DISCUSION Y PROYECCIONES

En los estudios efectuados con *Meloidogyne* sp. se reconfirmó el comportamiento promisorio de los genotipos de *C. canephora* T 3751 (1-2) y T3561 (2-1), sus descendencias presentaron altos porcentajes de plantas resistentes.

Esta información es consistente con los resultados de Bertrand y Peña (1994), obtenidos frente una población *Meloidogyne arenaria* de El Salvador, en donde los genotipos T3751 (1-2) y T 3561 (2-1) fueron los progenitores más destacados. La mejor combinación se obtuvo del cruzamiento entre ellos, presentando un porcentaje de plantas resistentes cercano al 80%.

En presencia de especies de *Meloidogyne* muy "agresivas" sobre café, que es el caso de las poblaciones de Guatemala y El Salvador, la utilización de una variedad porta-injertos con elevado nivel de resistencia se plantea como la vía obligada para su control. En esta primera variedad porta-injertos, obtenida del cruzamiento de T3751(1-2) por T3561 (2-1), se esperaría tener aproximadamente 80% de plantas resistentes a nivel de campo en estos dos países, y cerca del 100% de resistencia para los *Meloidogynes* de Costa Rica y Nicaragua.

Es importante señalar que en una mezcla de diferentes descendencias libres -que podría ser la situación de Robustas no seleccionados- se presentarían alrededor de 35% de plantas resistentes a los *Meloidogynes* "agresivos", o sea que habría una ganancia de 45% aproximadamente por el trabajo de selección.



El estudio con *Pratylenchus* indica que los genotipos T 3751(1-2) y T 3561(2-1) tienen un buen nivel de tolerancia a este nemátodo. Bajo las condiciones del experimento -plantas muy jóvenes y macetas pequeñas-, la "presión de inóculo" es mucho más drástica que en condiciones de campo o aún de vivero comercial. Por lo tanto puede pensarse que este nivel de tolerancia es satisfactorio. Los resultados concuerdan con las observaciones empíricas realizadas en el campo, donde el injerto aún practicado sobre porta-injertos de "canephoras" no seleccionados, presenta un control adecuado del nemátodo *Pratylenchus spp.*

En relación a las cochinillas de la raíz, otro importante parasito del cafeto en Centroamérica, se demostró que *C. canephora* ofrece una alta tolerancia al desarrollo de este insecto, García (1993) obtuvo resultados interesantes con el genotipo Robusta T 3751 (1-2), mostrándose como un soporte poco propicio para el desarrollo del insecto.

#### 4. MULTIPLICACION Y DIFUSION DE LA VARIEDAD PORTA-INJERTO.

Esta actividad es coordinada y ejecutada por la unidad de biotecnología CIRAD/PROMECAFE establecida en el CATIE, Costa Rica. El objetivo es multiplicar vegetativamente las plantas madres T3561(2-1) y T3751(1-2).

La multiplicación de las plantas madres se realiza en el CATIE por medio de embriogénesis somática *in vitro*. Esta técnica es conocida desde hace varios años y su aplicación en café se inició en 1970. Consiste en tomar partes somáticas de la planta -pedazos de hoja generalmente-, los cuales son introducidos *in vitro* mediante una desinfección adecuada y establecidos en un medio de cultivo específico que permitiría la formación de callos embriogénicos, a partir de estos callos se forman embriones (somáticos), con un desarrollo similar al de un embrión de semilla, hasta la formación de una plantita. Este proceso *in vitro* lleva un tiempo de 5 a 6 meses en laboratorio.

La etapa siguiente incluye el enraizamiento y aclimatación de las plantas fuera del laboratorio (*ex vitro*). Esto se realiza en invernadero sembrando las plantitas en bolsas y aclimatándolas progresivamente desde humedad relativa saturante (100%) hacia valores más bajos de humedad. Después de tres meses en invernadero las plantas pueden transferirse al vivero, donde pasarán de 4 a 5 meses antes de plantarse en campo definitivo. Luego de su desarrollo en vivero serán trasladados a campos o lotes "semilleros", aislados de otros "canephoras" para evitar contaminación con polen extraño. La semilla híbrida obtenida por polinización libre entre los dos clones se pondrá a disposición de los productores de café para sus programas de injertación.

Para la difusión de las plantas madres, se está enviando actualmente a los países que poseen un Laboratorio de Cultivo de Tejidos, un centenar de callos embriogénicos para producir miles de embriones somáticos. Cada Laboratorio se encargará de las etapas complementarias, o sea, desarrollo de embriones y aclimatación. Estas etapas vitales constituirán el mayor volumen de trabajo para el último y decisivo año del Proyecto.

Complementariamente se evaluarán en este año nuevos genotipos de *C. canephora* para disponer de una base mas amplia de progenitores, con resistencia a los principales grupos de nematodos fitoparásitos del cafeto en Centroamérica.